

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-030605

(43)Date of publication of application : 02.02.1999

(51)Int.Cl.

G01N 27/447

(21)Application number : 10-123273

(71)Applicant : BIO RAD LAB INC

(22)Date of filing : 06.05.1998

(72)Inventor : HOCHSTRASSER DENIS FRANCOIS

(30)Priority

Priority number : 97 851829 Priority date : 05.05.1997 Priority country : US

(54) TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS APPARATUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a two-dimensional electrophoresis apparatus which supplies separability far higher than that obtained by a one-dimensional separation as a useful technology for separating a complex protein mixture.

SOLUTION: A strip gel and a slab gel which may be water-expandable are combined on a common support for two-dimensional electrophoresis. The strip gel is separated from the slab gel by a fluid-impermeable and electrically insulative barrier. The barrier is preferably a wall which surrounds and forms a reservoir for containing the strip gel. A first dimension separation is carried out by pouring a liquid sample and a buffer solution into the reservoir to expand the gel, loading the sample into it, and feeding a current to the reservoir. The barrier which is easily breakably connected with the support is detached, so that the strip gel comes into contact with the slab gel to carry out a second dimension separation.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 06.05.1998

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3042774

B7

[Date of registration] 10.03.2000

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection] [REDACTED]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right] 10.03.2005

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

Patent & Utility Model Concordance

MENU***SEARCH******NEWS******HELP***

Document Number list

	1	2	3	4	5
Application Number	10-123273(1998)				
Unexamined Publication Number	JP,11-030605,A(1999)				
Examined Publication Number					
Registration Number	JP,3042774,B				

Please choose a Kind code with Display Type.

Kind code Display Type

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-30605

(43) 公開日 平成11年(1999)2月2日

(51) Int.Cl.⁶

G 0 1 N 27/447

識別記号

F I

G 0 1 N 27/26

3 1 5 H

審査請求 有 請求項の数12 OL 外国語出願 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願平10-123273

(22) 出願日 平成10年(1998)5月6日

(31) 優先権主張番号 08/851829

(32) 優先日 1997年5月5日

(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591099809

バイオーラッド ラボラトリーズ, インコ
ーポレイティド
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547,
ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル
ドライブ 1000

(72) 発明者 ドゥニ フランソワ ホフシュトラセール
スイス国, ジュネーバ, 1245 コロンジュ
ーベルリブ, シュマン ドゥ ラ サボニ
エール, 27

(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)

(54) 【発明の名称】 二次元電気泳動装置

(57) 【要約】

水膨張であってよいストリップゲルとスラブゲルとを二
次元電気泳動用の共通支持体上で組合せる。ストリップ
ゲルは流体不浸透性且つ電気絶縁性のパリヤーによりス
ラブゲルから隔離する。かかるパリヤーはストリップゲ
ルを含むためのリザーバーを形成する囲いの一枚の壁で
あるのが好ましい。第一次元分離は液体サンプル及び緩
衝液をリザーバーの中に入れることでゲルを膨張させ、
そしてそれにサンプルを装填し、次いでリザーバーに電
流を流すことにより実施する。この支持体に破壊容易式
に連結したパリヤーを取り外し、そして第二次元分離のた
めにストリップゲルをスラブゲルと接触させる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プレキャスト二次元電気泳動ゲルシステムであって、長いストリップ状の第一電気泳動分離媒体及びスラブ状の第二電気泳動分離媒体を含んで成り、前記長いストリップ及び前記スラブは単独の支持手段上に保持されており、且つ取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリヤーで互いに隔離されている、前記システム。

【請求項2】 前記長いストリップが液体保持受け器を構成する壁により包囲され、前記壁の一枚が前記取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリヤーである、請求項1記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項3】 前記長いストリップが、前記第一ゲルを外気との接触から完璧に隔離する囲いの中に入っている、前記囲いの一枚の壁が前記取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリヤーであり、そして前記囲いの別の壁が取外し可能な水分不浸透性シールである、請求項1記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項4】 前記長いストリップが水性液体の吸収により膨張可能である乾燥ゲルである、請求項1記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項5】 前記単独の支持手段が一組の実質的な平行な支持プレートである、請求項1記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項6】 前記長いストリップ及び前記スラブがボリアクリルアミドゲルである、請求項1記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項7】 前記長いストリップがその縦方向に広がる一定のpH勾配を形成する所定の分布でその上に固定された帯電基を含む、請求項1記載のプレキャスト二次元電気泳動ゲルシステム。

【請求項8】 サンプルを二次元電気泳動により成分へと分けるための方法であって、

(a) 前記サンプルを第一及び第二電気泳動分離媒体を含んで成る二次元電気泳動設備の第一電気泳動分離媒体の上に装填する、ここで当該第一電気泳動分離媒体は長いストリップ状であり、そして当該第二電気泳動分離媒体はスラブ状であり、前記長いストリップ及び前記スラブは単独の支持手段上に保持されており、且つ取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリヤーで互いに隔離されている；

(b) 前記長いストリップに電場をかけ、前記サンプル成分を当該長いストリップ伝いに間隔の置かれたゾーンへと分割する；

(c) 前記バリヤーを取り外し、そして前記長いストリップにおけるゾーン全てを前記スラブと電気的及び流体的に接触させる；そして

(d) 前記長いストリップ及び前記スラブの双方に前記長いストリップに対して垂直方向において電場をかけ、前記スラブにおいて前記ゾーンの電気泳動分離を行う；ことを含んで成る方法。

【請求項9】 前記長いストリップが液体保持受け器を形成する壁により包囲され、その壁の一枚が前記取外し可能な流体不浸透性の電気絶縁バリヤーであり、そして(a)前記サンプルを前記液体保持受け器の中で前記長いストリップと流体接触させるように配置することを含んで成る、請求項8記載の方法。

【請求項10】 (a) 前記サンプルを水性緩衝溶液の中に希釈し、前記長いストリップを前記緩衝溶液のそれよりも小さい密度の水非混和性液で覆い、そして前記サンプルを含む前記緩衝溶液を前記液体保持受け器の中に、前記緩衝溶液、サンプル及び長いストリップが前記水非混和性液により覆われるようにして配置することを更に含んで成る、請求項9記載の方法。

【請求項11】 前記単独の支持手段が間にすき間を有する第一及び第二の実質的に平行な支持プレートとそのすき間の中の前記スラブとより成り、前記第一支持プレートは前記第二支持プレートの一辺を突き出した露出ストリップを有し、ここで前記長いストリップの前記露出ストリップに付着されているものであり、前記(C)前記長いストリップを前記すき間の中に移動させて前記スラブと接触させることを含んで成る、請求項8記載の方法。

【請求項12】 前記長いストリップがその縦方向に広がる一定のpH勾配を形成する所定の分布でその上に固定された帯電基を含み、そして(b)前記サンプル成分を等電点電気泳動によりゾーンへと分割することを含んで成る、請求項8記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

30 【発明の属する技術分野】 本発明は二次元電気泳動分離の分野に属する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】 二次元電気泳動は複雑なタンパク質混合物を分離するための有用な技術であり、往々にして一次元分離で得られるよりもはるかに高い分離能力を供するものである。

【0003】 その技術は成分混合物を2組の特性に従って順々に分けることを可能とし、多種多様な分離パラメータの組合せにある。一の組合せは電荷に基づく分離、それに続く分子量に基づく分離である。その他は一の濃度のゲルにおける分離、それに続く同じ材料であるが異なる濃度のゲルにおける分離である。二次元分離は

40 (1) pHの段階式変化を作り上げるため、(2)最初に均質ゲル、次いで孔質勾配ゲルで分離するため、(3)第一のタンパク質溶解剤と別の溶解剤とを含む媒体で分離するため、又はタンパク質溶解剤を一の濃度及び別の濃度で含む媒体において分離するため、(4)まだ不連続緩衝液系で、次いで連続衝撃液系で分離するため、並びに(5)まず等電点電気泳動で、次いで均質又は孔質勾配電気泳動で分離するため、にも利用されている。こ

50

のような組合せは血清又は細胞タンパク質、細菌タンパク質、非ヒストンクロマチンタンパク質、リボソームタンパク質、リボヌクレオタンパク質とリボソームタンパク質との混合物、並びに核酸等の多種多様な成分を分離するために利用できうる。

【0004】二次元電気泳動システムの第一次元は典型的には1.0mm付近の直径を有する長い桿状ゲルで実施され、泳動及び分離は桿の縦方向に伝いで行われる。溶質が桿伝いで個々のゾーンへと分類されたら、この桿をスラブゲルの一辺伝いに配置し、そしてこの桿及びスラブに電流を、桿の軸と垂直の方向又は横断方向にわたってかける。このことは、桿の各ゾーンからスラブゲルへの溶質の泳動、及び各ゾーン内での溶質の分離を及ぼす。

【0005】二次元電気泳動における問題は、第一次元分離を行った後の桿状ゲルの取扱い及び第二次元分離の準備のためにこのゲルをスラブゲルと接触させるように設置することにある。第一次元分離は一般に桿状ゲルをそれをキャスティングするチューブの中に入れたまま実施する。チューブ内での分離を実施したら、この桿を物理的にチューブから取外し、次いでスラブゲルの露出辺伝いに設置する。チューブからの桿の取り出し及びそれをスラブゲルの辺伝いに設置する作業は慎重な取扱いを要し、そしてたとえ十分な注意を払ったにしても、ゲルは往々にして損傷し、そして溶質ゾーンはゆがむ又は乱れるものである。桿とスラブゲルとの製剤及び完全接触はゲル間での電気的連続性及び障害のない溶質流動の双方を達成するために重要である。更に、桿の取扱い及び設置にかなりの時間がかかり、そして失敗はデーターの損失をもたらしうる。ゲルストリップが桿の代替品として利用できるが、似たような問題、失敗の機会及び再現性の欠如を有する。

【0006】多くのこれらの問題は、二通りの分離を介在式挿入又はいづれかのゲルの取外しを行うことなく連続して行うことを可能にする、長い第一次元ゲル及びスラブ状第二次元ゲルの双方を共平面配置において含むゲルパッケージにより解決されている。一のかかる配置及びその利用方法は1989年10月17日に特許された米国特許第4,874,490号「Pre-Cast Gel Systems for Two-Dimensional Electrophoresis」Denis F. H ochstrasser及び1994年9月28日公開のBio-Rad Laboratories Inc.の対応ヨーロッパ特許第0,366,897 B1号において開示されている。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明はプレキャスト二次元ゲルシステムに関し、二次元分離のそれそのためのゲルは共通の支持体の上で保持され、且つ使用される。第一次元ゲルは長いストリップであり、このストリップの縦方向において電流を受容するように配備され、一方第二次元ゲルはこのストリップと対面し、そして好

ましくはそれと平行な辺を有する。このストリップ及びスラブは互いにバリヤーで隔離され、そのバリヤーは流体不浸透性（又は流体保持性）及び電気的に絶縁性であり、しかも取外し可能である。好適な態様において、このバリヤーはかかるストリップを包囲する受け器の一枚の壁であり、この受け器は液体、特に緩衝液の中に希釈されたサンプル自体を保持することが可能である。

【0008】本発明の一定の態様において、このストリップは水又は水性溶液の吸収より膨張する乾燥ゲルであり、これにより水性緩衝液の中に希釈されたサンプルはストリップを完璧に濡らして膨張させることができる。使用前に乾燥状態に保たれることを要するストリップのためには、この受け器はストリップを環境水分から隔離するように封じ込める取外し可能な不透湿性シールを更に含みうる。支持体のための好都合な構造は一組の平らで平行なプレートであり、一方のプレートは一方で他方のプレートよりも長さが長くなっている、長めのプレートの内面の一部を露出させている。

【0009】このスラブゲルはプレート間のすき門の中に保持され、同時にストリップゲルは長めのプレートに露出領域上で好ましくはストリップゲルと短めのプレートの最も近い辺との間にすき間を残して付着されている。

【0010】使用の際、一次元分離は、ストリップを流体保持性且つ電気的に絶縁性のバリヤーによりスラブから隔離して実施する。このバリヤーは壁のスラブ側上にエアースキ間を有する一様な保持壁であってよく、この場合電気絶縁はこのエアースキ間により、又はこのエアースキ間及び保持壁の双方により達成されうる。本発明の一定の形態において、このエアースキ間は好ましく、なぜならこれはバリヤーが長めのプレートの露出部分の上に配置されることを可能にし、そしてバリヤーの取外しを容易にするからである。第一次元分離を実施したら、このバリヤーを外し、そして2枚のゲルを第二次元分離のために接触させる。

【0011】これらの詳細及び本発明のその他の特徴は以下の説明により明らかとなる。

【0.012】

【発明の実施の形態】本発明は一般に任意の二次元分離に適用でき、そして第一の分離を第一次元（長いストリップ）で実施し、そして別の分離を第二次元（スラブ）で実施する手順において最も有用である。第一次元は例えば天然ゲルであってよく、乾燥でも膨潤型でもよく、又は担体両性電解質もしくは界面活性剤を含むゲルであってもよい。その他の例として、このゲルはDNAの分離のための特製のもの、例えば一の制限酵素を第一次元において用い、そして別の酵素を第二次元に使用できるもの、又は制限酵素を第一次元に使用し、そして変性剤を第二次元に使用するものであってよい。その他の例は電気泳動における当業者に自明であろう。

【0013】更なる例において、第一次元がpH勾配をストリップの継軸方向に含み、そして第二次元がpH勾配をストリップに対して垂直方向において有するか又は勾配を全く有さないものであってよい。ストリップのpH勾配は様々な態様で形成できる。それは例えばpH勾配を形成するように帯電した、又はかかる勾配を形成するように帯電可能な固定化基を有するマトリックスであってよい。他方、このpH勾配はストリップマトリックス内に固定されていない担体両性電解質により形成されていてよい。

【0014】固定化基を含むストリップは当業界において公知であり、そして市販されている。その例は引用することで本明細書に組み込む米国特許第4, 130, 470号 (Rosengren ら、1978年12月19日特許) に開示されている。このマトリックスは一様な支持材料、例えば顆粒、繊維もしくは膜材料、又はゲルであってよい。マトリックス材料の例はポリアクリルアミド、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、デンプン、シリコーンゲル、及びスチレンジビニルベンゼンのポリマー、並びにこれらの特性の組合せである。正に帯電した又は帯電可能な基の例はアミノ基及びその他の窒素含有基である。負に帯電した又は帯電可能な基の例はカルボン酸基、スルホン酸基、硼酸 (boronic acid) 基、及びホスホン酸基又はリン酸基、並びにこれらの酸のエステルである。その他の例は当業者に自明であろう。マトリックス上への基の固定化は共有結合、又はその他の手段であって其の位置を固定し、そして電場の影響下での又はマトリックスを通る流体又は溶質の移動によるその移動を防ぐものにより達成できる。帯電基をポリマーゲルマトリックスに組込む好適な手段は、帯電モノマー又は帯電架橋剤をゲルモノマーと共に重合させることによる。

【0015】基の濃度は好ましくは等電点電気泳動に適する固定化pH勾配を形成するように単調式に高める又は下げる状況で変えてよい。特定の濃度は本発明に重要ではなく、そして分離の必要性に応じて変わらであろう。典型的には、帯電基の濃度はゲル中で約10⁻² M～約10⁻⁴ Mの範囲であろう。長いストリップは更に好ましくは、使用前は乾燥状態であり、水の吸収により膨張可能なものである。一定のpH勾配を含む乾燥ストリップはPharmacia Blotech AB, Uppsala, Swedenより入手できる。

【0016】このスラブゲルは一般に水性ゲルであり、その例は広範囲のゲル濃度及び孔質度を有するポリアクリルアミドゲル、デンプンゲル及び寒天ゲルである。このゲルは均一な濃度又は濃度勾配を含んでよく、溶解剤を有しても有さなくともよく、又は様々なタイプ及び濃度の溶解剤を有してよく、そして連続又は不連続の緩衝系を有してよい。様々なタイプのゲルが当業者に自明であろう。

【0017】添付図面は本発明の一の実施例の詳細な図を供する。

【0018】図1の透視図及び図2の継方向断面図は本発明に係るプレキャストゲルカセット11を示し、このカセットの構造部材は長さ不均等の2枚の平らなプレート12, 13より成る。短めのプレート13は3つの辺が長めのプレート12の3つの辺と整合しており、そして露出した長めのプレートの内面の領域14が残っている。本発明の範囲に属する別の構造においては、このカセットは長めのプレートの一部を露出することなく構築される。2枚のプレート間のすき間はプレートの側辺伝いに位置する一組のスペーサー15, 16により設定され、そしてスラブゲル17はこのすき間の一部を占めている。プレート12, 13及びスペーサー15, 16は成形又は溶解により形成されるユニタリー構造であるか、又はスラブゲルサンドイッチ及びカセットの製造業者に周知の慣用の構造のクランプにより結合されたものである。長めのプレートの露出領域に隣接するすき間でのストリップ18は空のままとなっており、その理由は使用方法についての以下の説明より明らかとなる。

【0019】長めのプレートの露出領域14伝いにあるのは囲い21であり、液体の保持のための受け器をそれらがスラブゲル17と接触しないように保つように形成している。この囲いの一枚の壁23 (スラブゲル17に対面している壁) はその連結線分24が人的な加圧により簡単に破断できるように構築されている。その結果、壁23は第一次元分離が終了した後にすばやく且つきれいに除去できる。連結線分24は例えば筋付きとなっているか、もしくは囲い21の残りの部分よりも弱い材料でできていてよく、又は簡単に破壊でき、しかも破壊前は液体を保持できる連結を形成する任意のその他の手段より成ってよい。囲い21の残りの壁は好ましくは疎水性材料より成る。囲い21の頂部はリザーバー22の内容物を貯蔵及び輸送中に損傷から保護するため並びにその内容物を使用時まで乾燥状態に保つため、不透湿性材料25の取外し可能なストリップによりシールされていてよい。シール25は好ましくは指圧で剥がすことにより除去できるものである。

【0020】プラスチック裏地ストリップ27を有する乾燥一定pH勾配ゲル26のストリップがリザーバー22の内側に配置されている。本明細書に説明の通り、ストリップとして考えられているものには一般にプレキャストゲル、乾燥自然ゲル、又は乾燥一定pH勾配ゲルが含まれる。図2に示す配置において、プラスチック裏張りゲルはゲル側面26を支持プレート12に接触させて配置している。このゲルは同様に逆方向に配置してもよいが、この図に示している配置が好ましく、なぜならゲル26がプレート12に付着されるからである。乾燥ゲル及びプラスチック裏地はリザーバー22全体を占めておらず、リザーバーはその代わりにゲルの上方及びその他

方の両方に液体アクセスのためのクリアランスを残している。

【0021】図3及び4は使用のために用意されたカセットを示す。シール25を剥がす又は何らかして除去し、そして油引をリザーバーに添加してゲル及びその裏地にかぶせる。サンプル及び緩衝液の混合物32を次に添加する。油引はサンプル及び緩衝液の混合物32と非混和性であり、且つそれより低い密度であり、そして更にゲル26に吸収されないものを選定する。かくしてサンプル及び緩衝液の混合物32は油引の下をくぐり通ってゲルにより吸収され、ゲルを膨張させ、同時にゲル26及びサンプルと緩衝液との混合物32は油引により外気から保護される。この状況でリザーバーの中に入れるサンプル及び緩衝液の混合物の量はこの混合物がゲル26により完全に吸収され、そしてゲルの実質的に均一な膨張を及ぼすように選定される。ゲルが均一に膨張することは限定ではなく、そしてあまり均一に膨張しないゲルが容易に利用されうる。サンプル及び緩衝液混合物の典型的な容量は200μlである。

【0022】ゲルがサンプル緩衝液で膨張し、そして適当な時間（一般に1又は2時間）緩衝液で平衡にしたら、膨張ゲルにわたりその縦方向伝いに電流を流し、第一次元分離を実施する。電源とゲルとの電気的接触は囲い21の壁伝いの導線33、34（図4）及び支持プレート12の接触面伝いの短い距離により供される。電場の方向は矢印35で表示する。典型的な電圧は3000ボルトで4時間とする。サンプル成分の分離は等電点電気泳動により及ぼされ、成分を個々のゾーンへと分類させ、ここでこのゲルの縦方向にわたるその位置は成分の電荷（又は等電点）に対応する。等電点電気泳動の代わりに様々な電気泳動、例えばゾーン電気泳動及びその他の方法が利用でき、その分離はサンプル中に存在する様々な物質の分子量、電荷、等電点又はその他の区別される特徴に基づいて行われる。ここまでに説明してきた手順は好ましくは水平位置にある支持プレート12、13で実施しているが、この手順は垂直位置にあるプレートで実施することもできる。

【0023】第一次元分離が終了したら、油引をリザーバーから除去し、ゲルの縦方向伝いに間隔を置いたゾーンで配置されたサンプル成分を含む膨張ゲルが残る。第二次元分離のための緩衝溶液をリザーバーの中に入れ、

そしてゲルをこの緩衝液で適当な時間平衡にする。平衡化は例えば緩衝液を改めて2回、10分づつ適用することより成ってよい。この緩衝液は第一次元分離のために用いたものと異なる緩衝液であってよい。

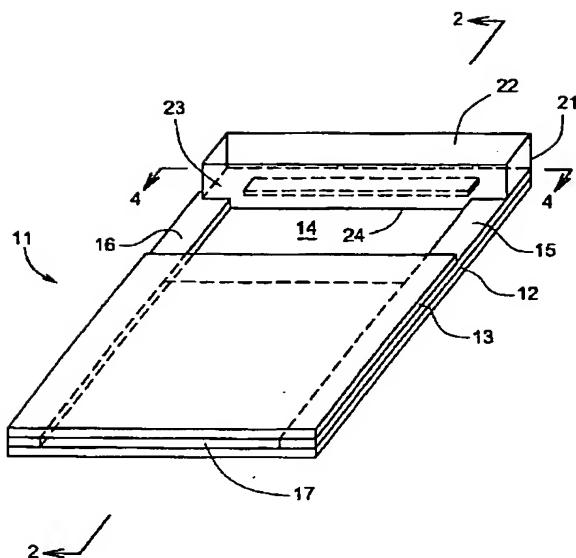
【0024】平衡化が完了したら、平衡緩衝液を取り除き、そして破壊可能な壁23を取外す。次いでカセットを好ましくは回転させて支持体12、13が図5に示すように垂直となり、pH勾配ゲルをその縦軸が水平となるように配置する。ゲル形成液体材料36、例えば新たなる緩衝溶液と混合した高温アガロースをスラブゲル17の上方の支持プレート間のすき間空間18の中に入れ、そして分離したゾーン（例えば、等電点電気泳動による勾配ゲルの如き）を含むストリップゲル26（ある態様においては、pH勾配ゲル）を液体材料36の中にすべり込ませる又は降ろし（矢印37で表示）、2枚のゲルが液体接触及び電気接触するようにする。好ましくは、ストリップゲル26を液体の中に完全に浸す。次いでこの液体を固化させるわけであるが、その後の工程は材料36が液体のままで実施することもできる。

【0025】いづれにせよ、カセットを垂直スラブゲルのために考案された慣用の電気泳動セルの中に入れる。適当な電気泳動セルの一例はBio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USAの製品Mini-PROTEAN（登録商標）II Cellである。同様に適当なその他の電気泳動セルがその他の商業的供給者から入手できる。次いで電気泳動を、矢印38で示す方向で電場をかけることにより実施し、第一次元分離ゾーンそれぞれ（即ち、一定の態様において、各等電点電気泳動ゾーン）の中の成分をゲル内の垂直線分伝いに分離させる。

【図面の簡単な説明】
 【図1】本発明に係るプレキャスト二次元ゲルカセットの透視図。
 【図2】図1の線分2-2伝いの図1のゲルカセットの縦方向断面図。
 【図3】第一次元分離のために用意したゲルカセットを示す、図2と類似の縦方向断面図。
 【図4】第一次元分離中のゲルを示す、図1の線分4-4伝いでの、図1のゲルカセットの横断面図。
 【図5】第二次元分離のために用意したゲルカセットを示す、図1及び2と類似の縦方向断面図。

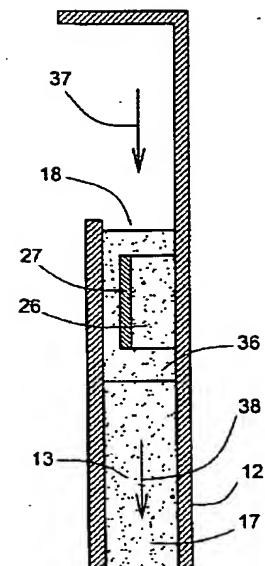
〔図1〕

图 1



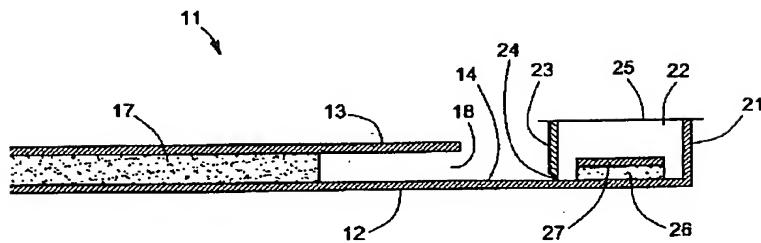
[図5]

5



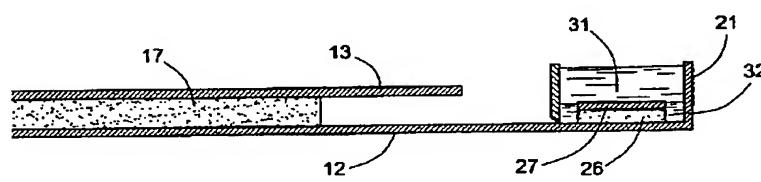
【図2】

2

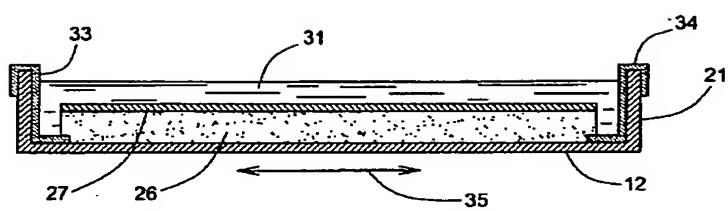


〔図3〕

63



【図4】

図
4

【外国語明細書】

1. Title of Invention

**TWO-DIMENSIONAL
ELECTROPHORESIS DEVICE**

2. Detailed Explanation of the Invention

This invention resides in the field of two-dimensional electrophoretic separations.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Two-dimensional electrophoresis is a useful technique for separating complex protein mixtures, often providing a much higher resolving power than that obtainable in one-dimension separations.

The technique permits component mixtures to be separated according to two different sets of properties in succession, and lends itself to a variety of different combinations of separation parameters. One combination is separation based on charge followed by separation based on molecular weight. Another is separation in a gel of one concentration followed by separation in a gel of the same material but of another concentration. Two-dimensional separations have also been used to create a stepwise change in pH, to separate first in a homogeneous gel and then in a pore gradient gel, to separate in media containing first one protein solubilizer and then another, or in media containing a protein solubilizer first at one concentration and then at another concentration, to separate first in a discontinuous buffer system and then in a continuous buffer system, and to separate first by isoelectric focusing and then by homogeneous or pore gradient electrophoresis. Combinations such as these can be used to separate many kinds of components, including serum or cell proteins, bacterial proteins, non-histone chromatin proteins, ribosomal proteins, mixtures of ribonucleoproteins and ribosomal proteins, and nucleic acids.

The first dimension of a two-dimensional electrophoresis system is typically performed in an elongate rod-shaped gel having a diameter in the vicinity of 1.0 mm, with migration and separation occurring along the length of the rod. Once the solutes have been grouped into individual zones along the rod, the rod is placed along one edge of a slab gel and the electric current is imposed across the rod and slab in a direction perpendicular or otherwise transverse to the axis of the rod. This causes the migration of

solutes from each zone of the rod into the slab gel, and the separation of solutes within each zone.

Difficulties in two-dimensional electrophoresis arise in the handling of the rod-shaped gel after the first dimension separation has occurred and in placing the gel in contact with the slab gel to prepare for the second dimension separation. The first dimension separation is generally performed while the rod gel is still in the tube in which it was cast. Once the separation in the tube has been performed, the rod is physically removed from the tube, then placed along the exposed edge of the slab gel. The extraction of the rod from the tube and the act of placing it along the slab gel edge require delicate handling, and even with the exercise of great care, the gel is often damaged and the solute zones are distorted or disturbed. Alignment and full contact of the rod with the slab gel are important for achieving both electrical continuity and unobstructed solute migration between the gels. Furthermore, considerable time is involved in the handling and placement of the rod, and errors can result in loss of data. Gel strips can be used as alternatives to the rod, but are susceptible to similar difficulties, opportunities for error, and a lack of reproducibility.

Many of these problems are eliminated by the gel packages that contain both the elongated first dimension gel and the slab-shaped second dimension gel in a common planar arrangement that permits the two separations to be done in succession without any intervening insertion or removal of either gel. One such arrangement and method of use are disclosed in United States Patent No. 4,874,490, issued October 17, 1989, entitled "Pre-Cast Gel Systems for Two-Dimensional Electrophoresis," Denis F. Hochstrasser, inventor, with corresponding European Patent No. 0 366 897 B1, of Bio-Rad Laboratories, Inc., specification published September 28, 1994. The present invention provides a new gel pre-cast gel structure and method.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention resides in a pre-cast two-dimensional gel system, with the gels for each of the two dimensions of the separation retained and used on a common support. The first dimension gel is an elongate strip arranged to receive an electric current in the longitudinal direction of the strip, while the second is a slab with an edge facing the strip, and preferably parallel to it. The strip and slab are isolated from each other by a barrier that is fluid-impermeable (or fluid-retaining) and electrically insulating, yet removable. In preferred embodiments, the barrier is one wall of a receptacle surrounding the strip, the receptacle capable of retaining a liquid, notably the sample itself diluted in a buffer solution. In certain embodiments of this invention, the strip is a dry gel that swells upon

imbibition of water or an aqueous solution, such that the sample diluted in aqueous buffer will fully wet and swell the strip. For strips that require being kept dry prior to use, the receptacle can further contain a removable moisture-impermeable seal that seals the strip against exposure to environmental moisture. A convenient construction for the support is a pair of flat parallel plates, one plate being greater in length than the other along one dimension to leave part of the inner surface of the longer plate exposed. The slab gel is then retained in the space between the plates while the strip gel is adhered to the longer plate on the exposed region, preferably with a gap between the strip gel and the closest edge of the shorter plate.

In use, the first dimension separation is performed with the strip isolated from the slab by the fluid-retaining and electrically insulating barrier. The barrier can be a solid retaining wall with an air gap on the slab side of the wall, in which case electrical insulation can be achieved by the air gap or by both the air gap and the retaining wall. In certain configurations of the invention, the air gap is a preferred feature since it permits the barrier to be located on the exposed portion of the longer plate and promotes easy removal of the barrier. Once the first dimension separation is performed, the barrier is removed and the two gels are placed in contact for the second dimension separation.

Details of these and other features of the invention will be apparent from the description that follows.

3. Brief Explanation of the Drawings

FIG. 1 is a perspective view of a pre-cast two-dimensional gel cassette in accordance with the present invention.

FIG. 2 is a longitudinal cross section of the gel cassette of FIG. 1, taken along the line 2-2 of FIG. 1.

FIG. 3 is a longitudinal cross section similar to that of FIG. 2, showing the gel cassette being prepared for the first dimension separation.

FIG. 4 is a transverse cross section of the gel cassette of FIG. 1, taken along the line 4-4 of FIG. 1, showing the gel during the first dimension separation.

FIG. 5 is a longitudinal cross section similar to that of FIGS. 1 and 2, showing the gel cassette being prepared for the second dimension separation.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION AND PREFERRED EMBODIMENTS

This invention is generally applicable to any two-dimensional separation, and finds its greatest utility in procedures in which one type of separation is performed in the first dimension (the elongate strip) and another in the second dimension (the slab). The first dimension, for example, can be a native gel, dry or swollen, or a gel containing a carrier ampholyte or a detergent. As other examples, the gels can be those specifically formulated for the separation of DNA -- for example, one restriction enzyme can be used in the first dimension and another in the second dimension, or a restriction enzyme can be used in the first dimension and a denaturing agent in the second dimension. Other examples will be readily apparent to those knowledgeable in electrophoresis.

In further examples, the first dimension can contain a pH gradient in the direction of the longitudinal axis of the strip, and the second dimension either a pH gradient in the direction perpendicular to the strip or no gradient at all. The pH gradient in the strip can be formed in a variety of different ways. It may for example be a matrix with immobilized groups that are either charged to form a pH gradient or chargeable to form such a gradient. Alternatively, the pH gradient can be formed by carrier ampholytes that are not immobilized in the strip matrix.

Strips containing immobilized groups are known in the art and commercially available. Examples are disclosed in United States Patent No. 4,130,470 (Rosengren *et al.*, issued December 19, 1978), the contents of which are incorporated herein by reference. The matrix may be a solid support material such as a granular, fibrous, or membrane material, or it may be a gel. Examples of matrix materials are polyacrylamide, cellulose, agarose, dextran, polyvinylalcohol, starch, silicon gel, and polymers of styrene divinyl benzene, as well as combinations of these materials. Examples of positively charged or chargeable groups are amino groups and other nitrogen-containing groups. Examples of negatively charged or chargeable groups are carboxylic acid groups, sulfonic acid groups, boronic acid groups, and phosphonic or phosphoric acid groups, as well as esters of these acids. Other examples will be readily apparent to those skilled in the art. Immobilization of the groups on the matrix can be achieved by covalent bonding or any other means that will secure the positions of the groups and prevent their migration under the influence of an electric field or due to the movement of fluids or solutes through the matrix. A preferred means of incorporating charged groups into a polymeric gel matrix is by copolymerizing charged monomers or charged crosslinking agents with the gel monomers.

The concentration of the groups will preferably vary in a monotonically increasing or decreasing manner to form an immobilized pH gradient suitable for isoelectric focusing.

The specific concentrations are not critical to the invention and will vary according to the needs of the separation. Typically, the concentration of the charged groups will range from about 10^2 M to about 10^4 M in the gel. The elongate strip is also preferably one that is dry prior to use, but swellable upon imbibition of water. Dry strips that contain immobilized pH gradients are available from Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden.

The slab gel will generally be an aqueous gel, examples of which are polyacrylamide gels, starch gels, and agar gel, with a range of gel concentrations and porosities. The gel can be of uniform concentration or contain a concentration gradient, with or without solubilizers or with solubilizers of varying types and concentrations, and with continuous or discontinuous buffer systems. The various types of gels will be readily apparent to those skilled in the art.

The drawings provide a detailed view of one illustrative embodiment of this invention.

The perspective view of FIG. 1 and the longitudinal cross section of FIG. 2 depict a pre-cast gel cassette 11 in accordance with this invention, the structural members of the cassette consisting of two flat plates of unequal length 12, 13, the shorter plate 13 having three edges aligned with three edges of the longer plate 12 and leaving a portion 14 of the inner surface of the longer plate exposed. In alternative constructions, still within the scope of this invention, the cassette is constructed without exposing a portion of the longer plate. The gap between the two plates is set by a pair of spacers 15, 16 positioned along the lateral edges of the plates, and the slab gel 17 occupies a portion of the gap. The plates 12, 13 and spacers 15, 16 will either be of unitary construction formed by molding or welding, or held together by clamps (not shown) of conventional construction well known to those skilled in the manufacture or use of slab gel sandwiches and cassettes. A strip 18 of the gap adjacent to the exposed portion of the longer plate is left empty, for reasons that will be apparent from the description below pertaining to the method of use.

Along the exposed portion 14 of the longer plate is an enclosure 21 forming a reservoir 22 for the retention of liquids in a manner keeping them out of contact with the slab gel 17. One wall 23 of the enclosure (the wall facing the slab gel 17) is constructed so that its joint line 24 is easily breakable by manual pressure. As a result, this wall 23 can be quickly and cleanly removed after the first dimension separation is completed. The joint line 24 can for example be scored or made of a weaker material than the remainder of the enclosure 21, or any other means of forming a connection that is easily broken yet capable of retaining liquid before being broken. The remaining walls of the enclosure 21 are preferably of a hydrophobic material. The top of the enclosure 21 can be sealed by a removable strip of moisture-impermeable material 25, both to protect the contents of the reservoir 22 from damage during storage and transportation and to keep the contents dry

prior to use. The seal 25 is preferably one that can be removed by peeling away with finger pressure.

A strip of dry immobilized pH gradient gel 26 with a plastic backing strip 27 is placed inside the reservoir 22. As explained elsewhere in this specification, possibilities for the strip in general include a pre-cast gel, a dry native gel, or a dry immobilized pH gradient gel. In the arrangement shown in FIG. 2, the plastic-backed gel is placed with the gel side 26 contacting the support plate 12. The gel can be placed in the reverse direction as well, but the arrangement shown in the drawing is preferred since the gel 26 will adhere to the plate 12. The dry gel and plastic backing do not occupy the full volume of the reservoir 22, the reservoir instead leaving clearance both above the gel and along its sides for liquid access.

FIGS. 3 and 4 show the cassette being prepared for use. The seal 25 is peeled away or otherwise removed, and oil 31 is added to the reservoir to cover the gel and its backing. A mixture of the sample and buffer 32 are then added. The oil 31 is selected as one that is immiscible with and of lower density than the sample and buffer mixture 32, and furthermore is not absorbed by the gel 26. The sample and buffer mixture 32 will then flow beneath the oil 31 to be absorbed by the gel, causing the gel to swell, while both the gel 26 and the sample and buffer mixture 32 are protected from the atmosphere by the oil 31. The amount of sample and buffer mixture placed in the reservoir in this manner will be selected such that the mixture is fully absorbed by the gel 26 and will cause substantially uniform swelling of the gel. It is not critical that the gel be uniformly swelled, and gels with less than uniform swelling can readily be used. A typical volume of sample and buffer mixture is 200 μ L.

Once the gel is swelled with sample and buffer and allowed to equilibrate with the buffer for an appropriate period of time (generally an hour or two), electric current is passed through the swelled gel along its length to perform the first dimension separation. Electrical contacts between the power supply and the gel are supplied by conductive leads 33, 34 (FIG. 4) along the walls of the enclosure 21 and short distances along the contacting surface of the support plate 12. The direction of the electric field is indicated by the arrow 35. A typical voltage is 3,000 volts for 4 hours. Separation of the sample components occurs by isoelectric focusing, causing the components to group themselves into discrete zones whose locations along the length of the gel correspond to the charges (or isoelectric points) of the components. As alternatives to isoelectric focusing, electrophoretic migration of various kinds can be used, such as zone electrophoresis and other methods, with separation occurring on the basis of molecular size, charge, isoelectric points, or other distinguishing characteristics of the various species present in the sample. The procedure described up to this point is preferably conducted with the support plates

12, 13 in the horizontal position, although the procedure can also be conducted with the plates in the vertical position.

Once the first dimension separation has been completed, the oil 31 is removed from the reservoir, leaving the swelled gel containing the sample components located in zones spaced apart along the length of the gel. Buffer solution for the second dimension of the separation is then placed in the reservoir and the gel is permitted to equilibrate to this buffer for an appropriate period of time. Equilibration can for example consist of two fresh applications of the buffer for ten minutes each. The buffer may be a different buffer than that used for the first dimension separation.

Once equilibration is completed, the equilibration buffer is removed, and the breakable wall 23 is removed. The cassette is then preferably rotated so that the support plates 12, 13 are vertical, as shown in FIG. 5, with the pH gradient gel positioned so that its longitudinal axis is horizontal. A gel-forming liquid material 36 such as hot agarose, mixed with the new buffer solution, is placed in the void space 18 between the support plates above the slab gel 17, and the strip gel 26 (which in some embodiments is a pH gradient gel), which contains the separated zones (as, for example in gradient gels, by isoelectric focusing), is then slid or otherwise urged down (as indicated by the arrow 37) into the liquid material 36, such that the two gels are in both fluid contact and electrical contact. Preferably, the strip gel 26 is fully immersed in the liquid. The liquid is then permitted to solidify, although the subsequent steps can also be performed while the material 36 remains in liquid form.

In either case, the cassette is then placed in a conventional electrophoresis cell designed for vertical slab gels. One example of a suitable electrophoresis cell is the Mini-PROTEAN® II Cell, a product of Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, California, USA. Other electrophoresis cells that are likewise suitable are available from other commercial suppliers. Electrophoresis is then conducted by imposing an electric field in the direction shown by the arrow 38, causing the components within each first-dimension separated zone (i.e., each isoelectrically focused zone, in certain embodiments) to separate along vertical lanes within the gel.

The foregoing is offered primarily for purposes of illustration. It will be readily apparent to those skilled in the art that the physical configurations, materials, operating conditions, procedural steps and other parameters of the system and method described herein may be further modified or substituted in various ways without departing from the spirit and scope of the invention.

4. Claims

1. A pre-cast two-dimensional electrophoresis gel system comprising a first electrophoretic separation medium in the form of an elongate strip and a second electrophoretic separation medium in the form of a slab, said elongate strip and said slab retained on a single support means and isolated from each other by a removable, fluid-impermeable, and electrically insulating barrier.
2. A pre-cast two-dimensional electrophoresis gel system in accordance with claim 1 in which said elongate strip is encircled by walls forming a liquid-retaining receptacle, one of said walls being said removable, fluid-impermeable, and electrically insulating barrier.
3. A pre-cast two-dimensional electrophoresis gel system in accordance with claim 1 in which said elongate strip is encased in an enclosure completely isolating said first gel from access to environmental air, one wall of said enclosure being said removable, fluid-impermeable, and electrically insulating barrier, and another wall of said enclosure being a removable, moisture-impermeable seal.
4. A pre-cast two-dimensional electrophoresis gel system in accordance with claim 1 in which said elongate strip is a dry gel that is swellable upon imbibition of an aqueous liquid.
5. A pre-cast two-dimensional electrophoresis gel system in accordance with claim 1 in which said single support means is a pair of substantially parallel support plates.
6. A pre-cast two-dimensional electrophoresis gel system in accordance with claim 1 in which said elongate strip and said slab are polyacrylamide gels.
7. A pre-cast two-dimensional electrophoresis gel system in accordance with claim 1 in which said elongate strip contains charged groups immobilized thereon in a selected distribution to form a fixed pH gradient extending lengthwise thereon.
8. A method for separating a sample into components by two-dimensional electrophoresis, said method comprising:
 - (a) loading said sample onto a first electrophoretic separation medium of a two-dimensional electrophoresis arrangement comprising first and second electrophoretic separation media, said first electrophoretic separation medium being

in the form of an elongate strip and said second electrophoretic separation medium in the form of a slab, said elongate strip and said slab retained on a single support means and isolated from each other by a removable, fluid-impermeable, and electrically insulating barrier:

- (b) imposing an electric field across said elongate strip to divide said sample components into zones spaced along said elongate strip;
- (c) removing said barrier and placing all zones in said elongate strip in electrical and fluid contact with said slab; and
- (d) imposing an electric field across both said elongate strip and said slab in a direction perpendicular to said elongate strip, to effect electrophoretic separation of said zones in said slab.

9. A method in accordance with claim 8 in which said elongate strip is encircled by walls forming a liquid-retaining receptacle, one of said walls being said removable, fluid-impermeable, and electrically insulating barrier, and (a) comprises placing said sample inside said liquid-retaining receptacle in fluid contact with said elongate strip.

10. A method in accordance with claim 9 in which (a) further comprises diluting said sample in an aqueous buffer solution, covering said elongate strip with a water-immiscible liquid of a density lower than that of said buffer solution, and placing said buffer solution containing said sample inside said liquid-retaining receptacle such that said buffer solution, sample and elongate strip are covered by said water-immiscible liquid.

11. A method in accordance with claim 8 in which said single support means is comprised of first and second substantially parallel support plates with a gap therebetween and said slab in said gap, said first support plate having an exposed strip extending beyond one edge of said second support plate, with said elongate strip adhered to said exposed strip, and (c) comprises moving said elongate strip into said gap to contact said slab.

12. A method in accordance with claim 8 in which said elongate strip contains charged groups immobilized thereon in a selected distribution to form a fixed pH gradient extending lengthwise thereon, and (b) comprises dividing said sample components into zones by isoelectric focusing.

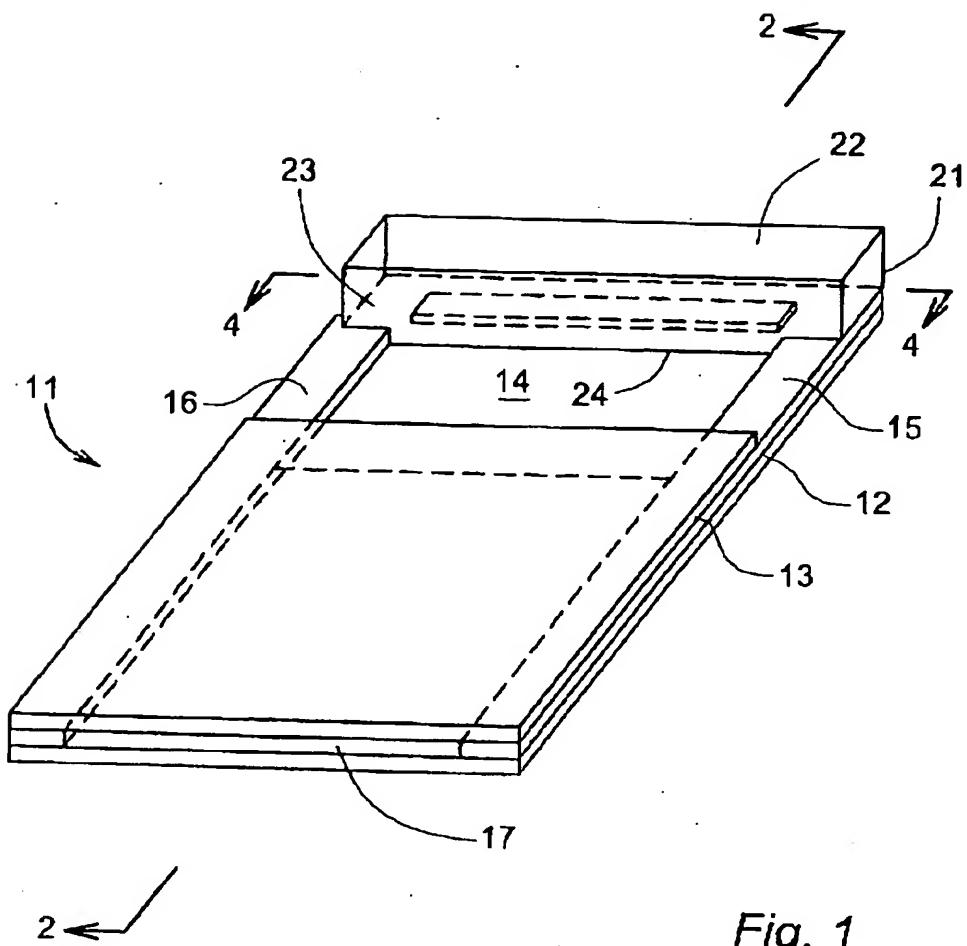


Fig. 1

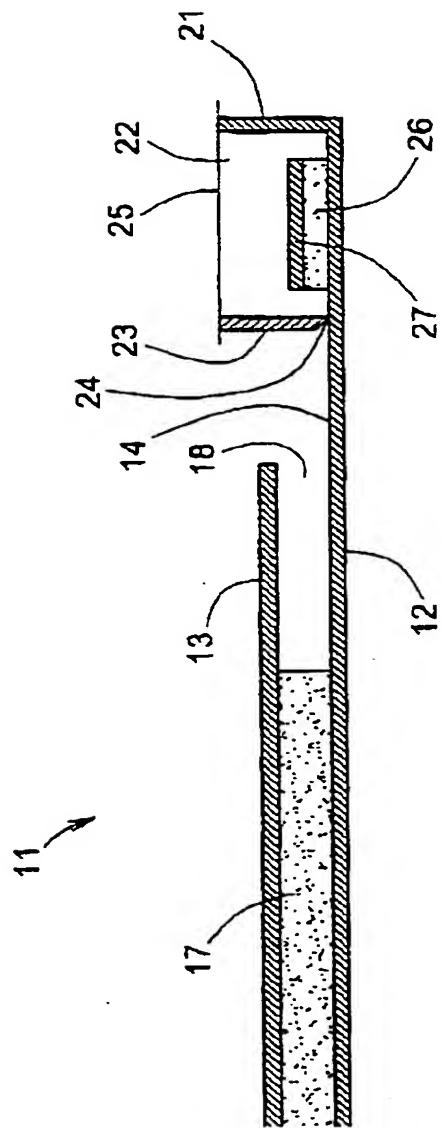


Fig. 2

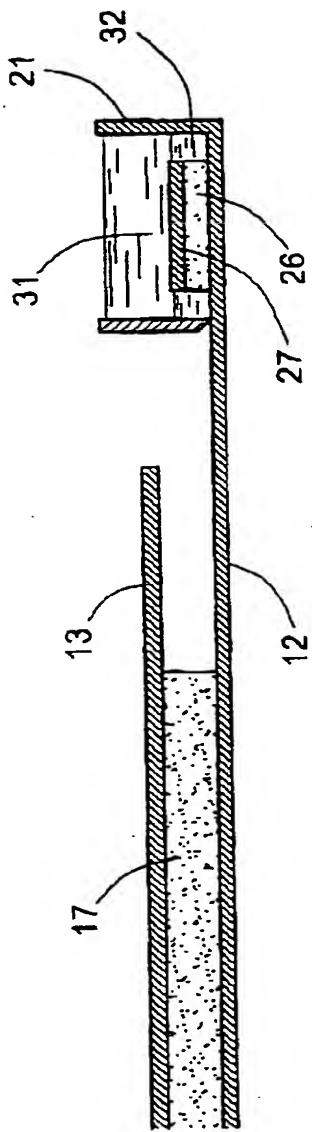


Fig. 3

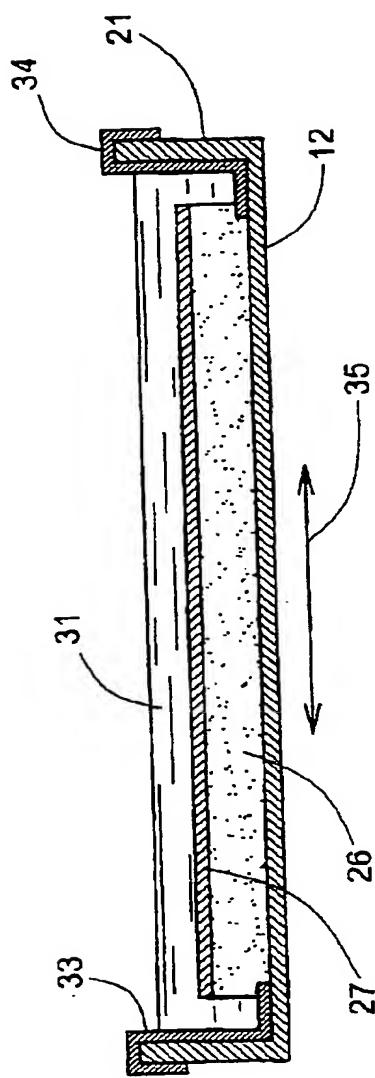


Fig. 4

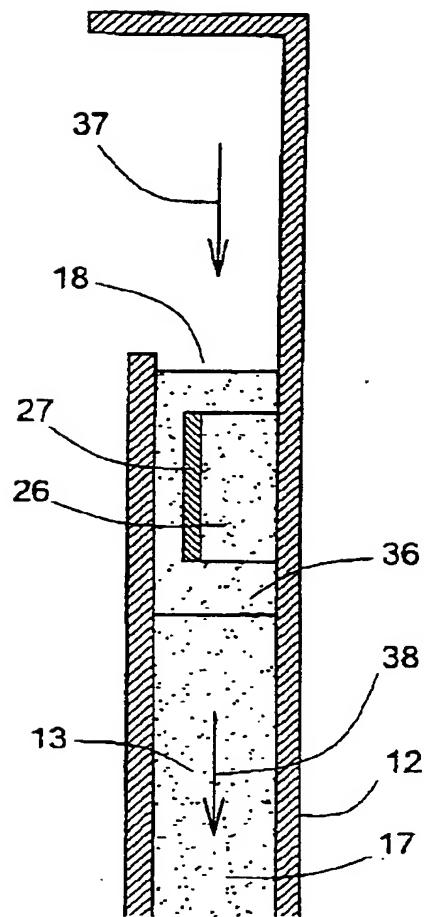


Fig. 5

1. Abstract

A strip gel that may be water-swellable and a slab gel are combined on a common support for two-dimensional electrophoresis, with the strip gel isolated from the slab gel by a fluid-impermeable and electrically insulating barrier, which is preferably one wall of an enclosure that forms a reservoir for containing the strip gel. The first dimension separation is performed by placing the liquid sample and buffer in the reservoir to cause the gel to swell and to load it with sample, then passing an electric current through the reservoir. The barrier, which is joined to the support in an easily breakable manner, is then removed, and the strip gel is placed in contact with the slab gel for the second dimension separation.

2. Representative Drawing

None